



Государственный комитет
Совета Министров СССР
по делам изобретений
и открытий

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(11) 526660

Document AL2
Appl. No. 09/826,206

(61) Дополнительное к авт. свид-ву —

(22) Заявлено 24.01.75 (21) 2099177/13

с присоединением заявки № —

(23) Приоритет —

Опубликовано 30.08.76 Бюллетень № 32

Дата опубликования описания 13.10.76

(51) М. Кл.² С 12К 1/02
С 12Д 13/06

(53) УДК 547.475.2
(088.8)

(72) Авторы
изобретения

Р. М. Алиева и М. Х. Шигаева

(71) Заявитель

Институт микробиологии и вирусологии АН Казахской ССР

(54) ШТАММ PSEUDOMONAS FLUORESCENS № 806—ПРОДУЦЕНТ 2-КЕТО-*l*-ГУЛНОВОЙ КИСЛОТЫ

1

Изобретение относится к микробиологической промышленности и касается получения нового штамма — продуцента 2-кето-*l*-гулновой кислоты, используемой при биологическом получении аскорбиновой кислоты в медицинской и пищевой промышленности.

Известный штамм *Pseudomonas fluorescens* С-4 характеризуется едва заметным ростом на средах с сорбозой в качестве единственного источника углеродного питания в отличие от остальных видов, у которых рост отсутствует полностью.

Новый мутантный штамм *Pseudomonas fluorescens* № 806 получен при ступенчатом воздействии УФ-лучей и двух супермутагенов типа N-метил-нитрозо-N-нитрозогуанилина и N-нитро-N-метилбнурета.

В результате проведенного воздействия отобран мутант *Pseudomonas fluorescens* № 806, который характеризуется следующими признаками.

Морфологические признаки.

Клетки прямые, палочковидные, мелкие, размеры 0,4—1,5 мк. Подвижные, встречаются в виде одиночных, чаще в виде коротких цепочек. Перитрихи, грамотрицательные. Спор не образуют.

Мясопептонный агар. Кремовые колонии, округлые, гладкие с ровными краями. Коло-

2

ни легко снимаются петлей. Пигмента не образуют.

Картофель и морковь. Рост неинтенсивный, образуют слабый налет бежевого цвета.

5 Физиологические свойства.

Аэроб, максимум роста при температуре от 28 до 35°C.

Молоко интенсивно пептонизирует на пять сутки с образованием сгустка желтого цвета.

Желатину разжижает умеренно, окончательного разжижения не наблюдается.

Крахмал слабо гидролизует. Клетчатку не гидролизует.

15 Сорбоза, глюкоза, галактоза интенсивно усваиваются, причем глюкоза по сравнению с исходным штаммом усваивается слабее.

Левулеза, арабиноза, мальтоза, лактоза, сахароза, фруктоза, декстрин, глицерин, маннит и дульцит не используются.

20 Нитраты восстанавливают на двенадцатые сутки.

Культуры штаммов — исходного *Pseudomonas fluorescens* С-4 и мутантного *Pseudomonas fluorescens* № 806 — хранятся в коллекции института микробиологии и вирусологии АН Казахской ССР.

25 Штамм *Pseudomonas fluorescens* № 806 является продуцентом 2-кето-*l*-гулновой кислоты и осуществляет непосредственное окисление сорбозы в 2-кето-*l*-гулновую кис-

BEST AVAILABLE COPY

лоту на среде с 10%-ной сорбозой и органическими компонентами в виде дрожжевого аутолизата и гидролизата казеина при pH среды 7,6, $t=28-30^{\circ}\text{C}$, обеспечивая выход продукта в количестве от 2,85 до 3,8 г на 100 мл среды.

Пример 1.

а) Получение посевного материала.

10 мл питательной среды, содержащей, %: сорбозу 1,0, аспарагин 1,0; KH_2PO_4 0,5, MgSO_4 0,1, FeSO_4 0,1, разливают в качалочные колбы по 100 мл, стерилизуют при 0,5 атм в течение 30 мин и засевают *Pseudomonas fluorescens* № 806, предварительно выращенным на скошенном агаре, из расчета 1 пробирка на 2 колбы. Рост посевного материала ведется при 28°C в течение 24 час на качалке, дающей 180 об/мин.

б) Ферментация.

10 л среды, содержащей, %: сорбозу 10,0, глицерин 0,5, кукурузный экстракт 3,0, MgSO_4 0,01; FeSO_4 0,01; KH_2PO_4 0,2, NaCl 0,2, воду дистиллированную 1 л (pH среды 7,5), разливают в 100 качалочных колб, стерилизуют при 0,5 атм в течение 30 мин. В охлажденную среду вносят посевной материал в количестве 10%. Колбы ставят на качалку при 180 об/мин. Ферментация продолжается 48 час. при 28°C , причем через каждые 6 час определяется 2-кето-*l*-гулоновая кислота методом бумажной хроматографии.

в) Определение содержания 2-кето-*l*-гулоновой кислоты методом бумажной хроматографии в системе: этилацетат, уксусная кислота, вода — 11:2:2. Восходящую хроматограмму обрабатывают О-фенилендиамидом. При изучении ее в УФ-свете обнаруживают желтое светящееся пятно, которое представляет собой 2-кето-*l*-гулоновую кислоту.

г) Химическое выделение 2-кето-*l*-гулоновой кислоты по методу Matusaka 1953. Preparation of Vitamin C by fermentation, J. Fermentation Fech. Japan, 31, 39-42.

С помощью центрифugирования отделяют культуральную жидкость от бактерий. В культуральную жидкость добавляют 3 г сульфида свинца и нагревают до 40°C , после чего оставляют на ночь. На следующий день над поверхностью раствора пропускают пары сероводорода, очищают, удалив сульфид свинца. Определяют количество Ca^{++} в фильтрате добавлением 5% щавелевой кислоты. Раствор подогревают и пропускают через ионообменную смолу JR-120, полностью удалив излишки Ca^{++} . Затем сгущают под пониженным давлением и получают сиропоподобный раствор. Водный раствор продукта в концентрации 1 г на 100 мл дает угол оптического вращения — $24,4^{\circ}$. В сиропообразную жидкость добавляют кристаллик чистой 2-кето-*l*-гулоновой кислоты, ставят в холодильник и через 24 час пускают выкристаллизовавшуюся 2-кето-*l*-гулоновую кислоту.

Пример 2. 10 л ферментации иной среды засевают 10%-ным посевным материалом

65 4
5 *Pseudomonas fluorescens* № 806, как описано в примере 1. Колбы ставят на качалку и ферментация продолжается в течение 48 час. Образование 2-кето-*l*-гулоновой кислоты наблюдается уже в первые часы ферментации (через 6 час). Однако наибольшее ее количество наблюдается к 48 час ферментации. К этому времени 2-кето-*l*-гулоновой кислоты в кристаллическом виде накапливается до 4,6 г.

10 10 Пример 3. 10 л ферментационной среды следующего состава, %: сорбоза 10,0, KH_2PO_4 0,2, K_2HPO_4 0,7, MgSO_4 0,01, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1, натрий лимоннокислый · $5\text{H}_2\text{O}$ 0,05, pH-7, засевают 10%-ным посевным материалом культуры *Pseudomonas fluorescens* № 806. Колбы ставят на качалку. Ферментация продолжается в течение 48 час. Образование 2-кето-*l*-гулоновой кислоты наблюдается уже через 6 час ферментации. К этому времени 2-кето-*l*-гулоновой кислоты в кристаллическом виде накапливается до 3,2 г.

15 15 Допустимые пределы концентраций ингредиентов питательных сред, %

20 20 а) Среда для выращивания посевного материала.

Сорбоза	1,0—2,0
Аспарагин	1,0—1,5
KH_2PO_4	0,2—0,5
MgSO_4	0,01—0,1
FeSO_4	0,01—0,1

25 25 б) Ферментационная среда.

Сорбоза	10,0—15,0
Глицерин	0,5—1,0
Кукурузный экстракт	3,0—5,0
MgSO_4	0,01—0,1
FeSO_4	0,01—0,1
KH_2PO_4	0,2—0,5
NaCl	0,2—0,5

30 30 Вода дистиллированная, л 1 pH=7,5

Формула изобретения

Штамм *Pseudomonas fluorescens* № 806 — продуцент 2-кето-*l*-гулоновой кислоты хранится в коллекции Института микробиологии и вирусологии АН Казахской ССР.

Морфологические признаки.

Клетки прямые, палочковидные, мелкие, размером 0,4—1,5 мк. Подвижные, встречаются в виде одиночных, чаще в виде коротких цепочек.

Споры не образуют.

Рост на средах.

55 55 Мясо-пептонный агар. Колонии кремового цвета, округлые, гладкие с ровными краями, легко снимаются петлей. Пигмента не образуют.

Картофель и морковь. Рост неинтенсивный, образуют слабый налет бежевого цвета.

Физиологические свойства.

Молоко. Интенсивно пептонизирует на пятые сутки с образованием сгустка желтого цвета. Желатина. Разжижает умеренно, окончательного разжижения не наблюдается.

Крахмал. Слаб гидролизует.

Клетчатка. Не гидролизует.

Сорбоза, глюкоза, галактоза интенсивно усваиваются.

Левулеза, арабиноза, мальтоза, лактоза, сахароза, фруктоза, декстрин, глицерин, маннит

и дульцит не используются.

Нитраты. Восстанавливает на двенадцатые сутки.

Максимум роста достигается при температуре от 28 до 35°C, аэроб.

BEST AVAILABLE COPY

Составитель М. Ларина

Редактор М. Дмитриева

Техред А. Камышникова

Корректор А. Дзесова

Заказ 1827/5

Изд. № 1554
ЦНИИПИ Государственного комитета СССР
по делам изобретений и открытий
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Тираж 575

Подписанное

Типография, пр. Салуна, 2